

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08421

研究課題名(和文) MLL融合白血病発症を受容する胎児造血幹細胞形質の解析

研究課題名(英文) Age dependent MLL-fusion leukemia development

研究代表者

久保田 翔 (Kubota, Sho)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：70747831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：年齢依存的な造血幹細胞性質の違いが、白血病の発症へもたらす影響を検証し、発達時期依存的な白血病発症モデルの解析を行う。また、マウスの骨髄は連続移植を行うことで、老化したマウスなどでも起きている炎症ストレスが造血幹細胞に加わり、造血幹細胞の性質が変化することが知られている。こうした造血幹細胞の細胞内環境の変化が、白血病の発症へもたらす影響を検証し、造血幹細胞ストレス依存的な白血病発症を解析する。そして、2つのモデルから得られた検証結果をもとに、白血病発症依存性を制御する造血幹細胞性質を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MLL融合がん遺伝子による白血病は年齢との関係性が非常に高いことがよく知られている。成人期における白血病の5%程度でMLL融合がん遺伝子が検出されるが、新生児期においては白血病の50-80%の頻度でMLL融合がん遺伝子が検出される。t(9;11)によって生じるMLL融合がん遺伝子の一つであるMLL-AF9は、AMLを引き起こす主要なMLL融合がん遺伝子である。MLL融合がん遺伝子を原因とした白血病は、成人に比べ胎児・新生児の生後一年未満の患者で非常に高い頻度で見られることの明確な理由は数十年いまだ不明なままである。本研究成果は、MLL融合由来白血病発症機構を理解することで治療の基礎基盤となる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of age-dependent differences in HSC properties on the development of leukemia and analyzed a developmental time-dependent model of leukemogenesis. It is also known that continuous transplantation of bone marrow from mice can add inflammatory stress to HSCs, which also occurs in aging mice, and change the properties of HSCs. We examined the effects of these changes in the intracellular environment of HSCs on the development of leukemia and analyzed HSC stress-dependent leukemogenesis. Then, based on the validation results obtained from the two models, we analyzed the HSC properties that regulate leukemogenesis.

研究分野：エピゲノム

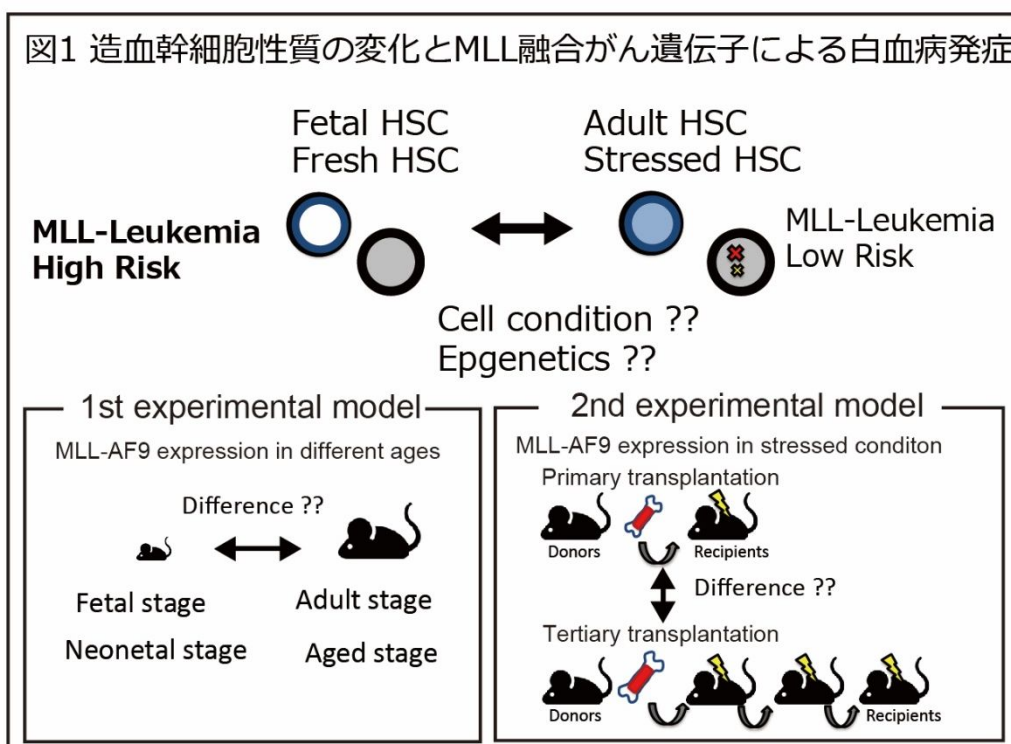
キーワード：白血病 エピゲノム MLL 小児 年齢依存 造血幹細胞 がん

1. 研究開始当初の背景

「がん遺伝子は形質転換受容細胞でのみ発がん能をもつ」と考えられている。この現象は、ある特定の遺伝子変異が特定の組織や特定の年齢層の腫瘍に集中して見られるという臨床的事実として観察される。MLL 融合がん遺伝子による白血病は年齢との関係性が非常に高いことがよく知られている。成人期における白血病の 5%程度で MLL 融合がん遺伝子が検出されるが、新生児期においては白血病の 50-80%の頻度で MLL 融合がん遺伝子が検出される。t(9;11)によって生じる MLL 融合がん遺伝子の一つである MLL-AF9 は、AML を引き起こす主要な MLL 融合がん遺伝子である。MLL 融合がん遺伝子を原因とした白血病は、成人に比べ胎児・新生児の生後一年未満の患者で非常に高い頻度で見られることの明確な理由は数十年いまだ不明なままである。

白血病の発生母地となる細胞は造血幹細胞である可能性が高いと考えられるが、胎児期、小児期、青壮年期、老年期といった発達段階において、造血幹細胞の性質は大きく異なることが知られている。一例として、胎児期では積極的に増殖し造血を担っているが、青壮年期ではその殆どが静止期に入っており、前駆細胞の増殖により定常状態の造血は担われている。造血幹細胞の発生段階依存的に白血病の発症依存性が異なるという報告はされてきたが、いまだ十分に明らかになっていない (Magee et al, Cancer Cell, 2012)。近年、マウスの作製技術や解析技術の発達によって、MLL による小児・新生児期の白血病発症依存性に関する研究が報告されているが、決定的な因子の発見には至っていない (Barrett et al., Cell Rep, 2016; Okeyo-Owuor et al., Blood Adv, 2019)。これらの研究において、MLL 依存的な白血病の発症が年齢依存的に起こることが示されているが、メカニズムの解析には十分に至っておらず、エピジェネティクスな解析が一切行われていない。

こういった状況の中、造血幹細胞のエピゲノム状態を含めた性質の差が、MLL 融合がん遺伝子による白血病発症に関わっていると考えた (図 1)。



## 2. 研究の目的

MLL 融合がん遺伝子の発症に関わる造血幹細胞性質を明らかにすることで、MLL 融合がん遺伝子特異的な治療法の開発の基礎基盤を確立することを目指した。

MLL 融合がん遺伝子の発症に関わる造血幹細胞性質を明らかにするために、発達時期依存的に MLL-AF9 を誘導出来るマウスモデルと連続移植による造血幹細胞ストレスを与えたマウスモデルの二つのモデルを用いて、白血病発症依存性を示す造血幹細胞の状態を見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

胎児期・小児期において、造血幹細胞は活発に自己複製を行っているが、成年期では主に静止期に入っており、緊急時のみ自己複製をすることが知られている。こうした造血幹細胞性質の違いが、白血病の発症へもたらす影響を検証し、発達時期依存的な白血病発症モデルの解析を行う。また、マウスの骨髄は連続移植を行うことで、老化したマウスなどでも起きている炎症ストレスが造血幹細胞に加わり、造血幹細胞の性質が変化することが知られている。こうした造血幹細胞の細胞内環境の変化が、白血病の発症へもたらす影響を検証し、造血幹細胞ストレス依存的な白血病発症を解析する。そして、2つのモデルから得られた検証結果をもとに、白血病発症依存性を制御する造血幹細胞性質を見出す。造血幹細胞の性質が変化するには、それに伴い、遺伝子発現パターン・エピジェネティクス状態も大きく変化する。二つのモデルから、それぞれ造血幹細胞のトランスクリプトーム・エピゲノム状態を解析し、白血病発症依存性を制御する造血幹細胞の特徴を明らかにし、白血病発症依存性を制御する造血幹細胞性質の解明する(図1)。

## 4. 研究成果

MLL-AF9 を発達時期依存的に誘導する為に、Rosa-LSL-MLL-AF9-IRES-GFP ノックインマウスを作製した。eR1-CreERT2 マウスと交配し、造血幹前駆細胞特異的にタモキシフェンによって、MLL-AF9 を誘導可能なマウスモデル (MLL-AF9-KI) を作製した。申請者は胎児期、小児期、成人期、老年期に MLL-AF9 を誘導発現し、生存曲線、末梢血の状態、白血病細胞の増殖などを全血球算定機、フローサイトメトリーを用いて解析した。MLL-AF9 を小児期、成人期両方の場合において、マウスは AML を発症した。しかし、発症速度に大きな違いがあり、成人期に誘導した場合に比較して小児期では早く白血病が発症しており、有意な差がみられた。発症前に2か月の時点で、最終的に異常増殖を行う顆粒球細胞の割合をフローサイトメトリーで比較すると、成人期に比較して小児期で末梢血中の顆粒球の割合が高いことが分かった。

造血幹細胞ストレスによる白血病発症への寄与を検証するため、上記の MLL-AF9-KI マウスに加え、コントロール用の Rosa-LSL-YFP-KI マウスおよび小児の MLL 融合がん遺伝子による白血病で二次変異として知られている NRas の活性化変異を導入した MLL-AF9-KI;NRasG12D を準備した。これらのマウスの骨髄を移植したマウスと2回連続移植を行ってから移植したマウスとで白血病の発症速度を比較した。その結果、初回移植のマウスに比較して連続移植したマウスでは AML の発症速度が遅れた。

次に、MLL-AF9 発現を誘導した後に、白血病発症前の造血幹細胞を採取して遺伝子

発現解析を実施した。その結果、MLL-AF9 標的遺伝子に加えて、MLL 融合蛋白と結合し、その白血病病態進展に不可欠なヒストン修飾酵素である DOT1L の標的遺伝子の発現レベルが、1 回移植の幹細胞に比較して、3 回移植後に MLL-AF9 を誘導した幹細胞では有意に抑制されていることが分かった。

エピゲノムレベルで変化が起こっているかを明らかにするため、MLL-AF9 の主要な結合タンパク質である DOT1L の標的である H3K79me の ChiP-seq 解析を行った。比較対象として胎児期に MLL-AF9 を誘導した場合と成人期に MLL-AF9 を誘導したマウスを準備して、造血幹前駆細胞を回収し、解析を行った。その結果、胎児期に MLL-AF9 を誘導したほうが、標的遺伝子 HOX 遺伝子 cluster 領域における H3K79me のレベルが上昇することが明らかになった。今後これらの成果を論文として国際紙に投稿予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takako Yokomizo-Nakano, Ai Hamashima, Sho Kubota, Jie Bai, Supannika Sorin, Yuqi Sun, Kenta Kikuchi, Mihoko Iimori, Mariko Morii, Akinori Kanai, Atsushi Iwama, Gang Huang, Daisuke Kurotaki, Hitoshi Takizawa, Hirotaka Matsui, Goro Sashida	4. 巻 220
2. 論文標題 Exposure to microbial products followed by loss of Tet2 promotes myelodysplastic syndrome via remodeling HSCs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20220962.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20220962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Atsushi Morimoto, Nobumasa Takasugi, Yuexuan Pan, Sho Kubota, Naoshi Dohmae, Yumi Abiko, Koji Uchida, Yoshito Kumagai, Takashi Uehara.	4. 巻 300
2. 論文標題 Methyl vinyl ketone and its analogs covalently modify PI3K and alter physiological functions by inhibiting PI3K signaling.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2024.105679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rikako Taniguchi, Yuto Moriya, Naoshi Dohmae, Takehiro Suzuki, Kengo Nakahara, Sho Kubota, Nobumasa Takasugi, Takashi Uehara.	4. 巻 154
2. 論文標題 Attenuation of protein arginine dimethylation via S-nitrosylation of protein arginine methyltransferase 1	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 209-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.12.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirotaka Ohguchi, Yasuyo Ohguchi, Sho Kubota, Kan Etoh, Ai Hamashima, Shingo Usuki, Takako Yokomizo-Nakano, Jie Bai, Takeshi Masuda, Yawara Kawano, Takeshi Harada, Mitsuyoshi Nakao, Takashi Minami, Teru Hideshima, Kimi Araki, Goro Sashida	4. 巻 1
2. 論文標題 Multiple myeloma associated DIS3 gene is essential for hematopoiesis, but loss of DIS3 is insufficient for myelomagenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood Neoplasia	6. 最初と最後の頁 100005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bneo.2024.100005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takuro Kameda, ...Sho Kubota... , Kazuya Shimoda	4. 巻 5
2. 論文標題 CARD11 mutation and HBZ expression induce lymphoproliferative disease and adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04284-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuqi Sun, Sho Kubota, Mihoko Imori, Ai Hamashima, Haruka Murakami, Jie Bai, Mariko Morii, Takako Yokomizo-Nakano, Motomi Osato, Kimi Araki, Goro Sashida	4. 巻 115
2. 論文標題 The acidic domain of Hmga2 and the domain's linker region are critical for driving self-renewal of hematopoietic stem cell	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 553-562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03274-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Supannika Sorin, Sho Kubota, Sofiane Hamidi, Takako Yokomizo-Nakano, Kulthida Vaeteewoottacharn, Sopit Wongkham, Sakda Waraasawapati, Chawalit Pairojkul, Jie Bai, Mariko Morii, Guojun Sheng, Kanlayanee Sawanyawisuth, Goro Sashida	4. 巻 36
2. 論文標題 HMGN3 represses transcription of epithelial regulators to promote migration of cholangiocarcinoma in a SNAI2-dependent manner	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202200386R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Terumasa Umemoto, Alban Johansson, Shah Adil Ishtiyahq Ahmad, Michihiro Hashimoto, Sho Kubota, Kenta Kikuchi, Haruki Odaka, Takumi Era, Daisuke Kurotaki, Goro Sashida, Toshio Suda	4. 巻 41
2. 論文標題 ATP citrate lyase controls hematopoietic stem cell fate and supports bone marrow regeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e109463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2021109463.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sho Kubota
2. 発表標題 Inflammatory stress tolerance of hematopoietic stem cell is activated by Hmga2
3. 学会等名 The 5th KU-KAIST Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保田翔、白潔、森井真理子、平山真弓、指田吾郎
2. 発表標題 HMGA による造血幹細胞制御機構の解析
3. 学会等名 第 27 回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------